



TITLE:

Targeted mutagenesis in medaka using targetable nuclease systems(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Ansai, Satoshi

CITATION:

Ansai, Satoshi. Targeted mutagenesis in medaka using targetable nuclease systems. 京都大学, 2016, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19765>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により本文は2018-12-01に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	安 齋 賢
論文題目	Targeted mutagenesis in medaka using targetable nuclease systems （ゲノム編集ツールを用いたメダカにおける標的遺伝子破壊）		
（論文内容の要旨）			
<p>遺伝学的解析は、遺伝子の生体内での機能を知るための強力な手法の1つである。近年、様々な生物においてゲノム解読が飛躍的に進展したことから、対象遺伝子の破壊によって生じる表現型からその機能を解析する、逆遺伝学的な手法の重要性が増大している。しかし、魚類においては標的遺伝子改変技術が確立されておらず、逆遺伝学的なアプローチによる遺伝子機能解析は進んでいなかった。そこで本論文は、遺伝学的解析に適した小型魚類モデルとしてメダカ（<i>Oryzias latipes</i>）を用い、魚類での簡便な逆遺伝学的解析手法の確立を検討した結果をまとめたものであり、主な内容は以下のように要約される。</p> <p>第1章では、魚類における逆遺伝学的解析の進展が遅れている現状について触れ、その解決方策として、標的配列を改変可能なヌクレアーゼ（ゲノム編集ツール）によるDNA切断によって任意の場所における遺伝子改変を誘導する技術（ゲノム編集）の適用が期待できることについて述べている。</p> <p>第2章では、EGFP遺伝子を標的とするZFN（zinc finger nuclease）を用いてメダカゲノム上に存在する遺伝子の破壊を行っている。ZFNをRNAとして導入した個体では、骨格筋でのGFP蛍光の消失及び標的配列特異的な欠失・挿入変異の誘導を確認した。また、導入変異が生殖細胞においても誘導され、様々な効率（6–100%）で次世代に伝達されることも示した。</p> <p>第3章では、ZFNの改良型であるTALEN（transcription activator-like effector nuclease）を用い、メダカ内在性遺伝子である<i>DJ-1</i>を標的とした遺伝子破壊を行った。TALEN導入個体では、標的配列特異的な欠失・挿入変異が非常に高い効率で誘導されることを見いだしている。特に、交配実験に用いた7個体全てにおいて、生殖細胞系列での高効率な変異導入（44–100%）が見られ、TALENが有用なゲノム編集ツールであることを示した。また、標的を認識するTALドメインについて欠失変異体を作製し、特に高効率に変異を誘導できる構造を発見した。</p> <p>第4章では、TALENを用いた標的遺伝子破壊をより簡便に行うためのいくつかの手法を記載した。初めに変異検出法として、マイクロチップ電気泳動装置によるヘテロ二重鎖移動度解析（HMA）が有用であることを示した。続いてTALENの設計手法として、切断配列近傍の短いリピート配列が誘導変異配列を偏らせること、これまで必須と考えられてきた5'の“T”が切断に必須ではないことを明らかにした。</p> <p>第5章では、より標的配列の改変が容易なCRISPR/Casシステムを用いた標的遺伝子破壊を試みた。TALENと同様に内在性の<i>DJ-1</i>遺伝子と標的として、guide RNAを設計しメダカ受精卵に導入した所、標的配列周辺で非常に高い効率での欠失・挿入変異の誘導に成功した。一方、1種類のguide RNAについてはメダカゲノム中の類似配列2箇所でのoff-target変異の導入が確認され、特異性の検討が問題となることを示した。</p> <p>第6章では、確立した標的遺伝子破壊技術を特に成魚の行動表現型の解析に活用するため、メダカの自動行動解析システムの開発を行った。5種類の行動テストを行い、抗うつ剤フルオキセチンの慢性投与の不安関連行動及び社会性行動への影響を評価した。その結果、有意な不安関連行動の低下及び社会性行動の変化を検出し、開発したシステムが行動表現型解析に利用可能であることを示した。</p>			

第7章では、前章で確立した行動解析系が変異体の表現型同定に実際に有用であることを示すため、神経伝達物質であるセロトニンの合成に必要な*tph2*遺伝子について欠損変異体を作製し、その解析を行った。始めに、作出したホモ変異体において脳内の*tph*活性が低下し、特に脳幹部縫線核においてセロトニンが欠失することを示した。行動表現型に関して、*tph2*の欠損は不動行動の顕著な増加といった不安傾向の上昇や、社会性行動のわずかな変化を引き起こすことを明らかにした。

第8章では、本論文で確立した標的遺伝子改変及び行動表現型解析手法について総括し、メダカを用いた様々な生命現象に関わる基礎研究や医学研究、さらに水産重要種における分子育種への応用における展開の可能性について述べている。

以上より、ゲノム編集ツールを用いた標的遺伝子破壊はメダカにおいて有効であり、任意の遺伝子について変異系統を作出する上で有用な手法であることを示している。また、本研究で新たに確立した行動解析システムを用いることで、メダカ成魚の行動について逆遺伝学的なアプローチでの解析が可能であることを示した。これらの技術は、メダカをモデルとした逆遺伝学的な生命現象の解析を飛躍的に進めるとともに、水産重要種に展開することで分子育種の進展にも貢献すると結論している。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

ゲノム解読の進展とともに、魚類においても多くの遺伝子の存在が確認されているが、その大部分の生体内での機能は不明である。個々の遺伝子機能を解析する上で、目的の遺伝子上に変異を導入しそれによって生じる表現型を評価する逆遺伝学的な解析手法は有効な手段である。しかし、魚類では標的遺伝子改変手法が困難であり、このようなアプローチでの機能解析は進んでこなかった。本論文は、メダカにおいてゲノム編集ツールを用いた標的遺伝子破壊技術の確立を進めるとともに、本技術が生体内での様々な遺伝子機能を理解する上での有用性を示すことを目的としたものであり、主要な成果として評価できる点は次の通りである。

1. 3種類のゲノム編集ツール (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas) の全てについて、メダカ受精卵への導入によって標的領域周辺での小規模な欠失・挿入変異の誘導が可能であることを示した。また、それらの変異が次世代に伝達され、変異系統の作出が可能であることも明らかにした。さらに変異検出法や標的配列選択に関わる基準について改善を行い、より簡便かつ効率的に変異系統を作出する手法を確立した。
2. 変異体の成魚における行動表現型を解析するための行動解析システムを開発し、特に不安関連行動と社会性行動を解析する実験系を構築した。また、ゲノム編集ツールを用いて作製した*tph2*変異メダカにおいて実際に不安関連行動の有意な上昇を検出し、本研究で確立した技術が生体内での遺伝子機能のうち、特に魚類の行動に関わる機能を知るための有用なツールであることを示した。

以上のように、本論文の成果は、魚類における標的遺伝子破壊技術の礎を築き、生体内での遺伝子機能解析の進展に大きく貢献するものであり、海洋生物機能学、遺伝子工学、行動神経生物学、水産学に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成28年2月8日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）